

**Über die Veränderungen
des Stoffwechsels von Leukocyten
und Tumorzellen
durch Antigen-Antikörper-Reaktionen**

Horst Herrschaft

1963

Aus der I. Medizinischen Universitäts-Klinik Frankfurt/Main

Direktor : Professor Dr. med. F. Hoff

ÜBER DIE VERÄNDERUNGEN DES STOFFWECHSELS VON LEUKOCYTEN
UND TUMORZELLEN DURCH ANTIGEN - ANTIKÖRPER - REAKTIONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt/Main

vorgelegt von
Horst Herrschaft
aus Gelsenkirchen

1963

Dekan : Prof. Dr. Krücke

Referent ; Prof. Dr. Fischer

Korreferent ; Prof. Dr. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung : 21. 5. 1963



Herrn Professor Dr. med. H. Fischer danke ich für die Überlassung des Themas, für die Einführung in das Sachgebiet sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Überwindung zahlreicher Schwierigkeiten, die sich bei der Durchführung dieser Arbeit einstellten.

Fräulein Dr. I. Haupt und Fräulein Ch. Vogt bin ich in Dankbarkeit verbunden für ihre stete und bereitwillige Hilfe.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551903_0009

Inhaltsangabe

	Text <u>Seite</u>	Versuchsprotokoll <u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	7	
Problemstellung		
II. <u>Methoden</u>	10	
1. Gewinnung der Leukocyten	10	
2. Gewinnung der Tumorzellen	10	
3. Stoffwechseluntersuchungen	11	
a) Messung des Sauerstoffverbrauchs	11	
b) Messung der Milchsäurebildung	13	
4. Serologische Untersuchungen	15	
a) Bestimmung von Serum-Komplement	15	
b) Bestimmung der lytischen Aktivität von Serumextrakten	15	
5. Inkubationsmedien	16	
III. <u>Ergebnisse</u>	17	40
Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reak- tionen auf den Stoffwechsel und die Morpho- logie von Leukocyten und Tumorzellen	17	
1. Der Einfluß von Serum, das durch eine Anti- gen-Antikörper-Reaktion v o r b e - h a n d e l t war, und dem eiweißfreien Extrakt eines solchen Serums	18	
a) auf Leukocyten	18	41
b) auf Tumorzellen	21	42
2. Der Einfluß einer Antigen-Antikörper- Reaktion w ä h r e n d i h r e s A b l a u f e s im Serum	23	
a) auf Leukocyten	24	43
b) auf Tumorzellen	25	44

	<u>Text</u> <u>Seite</u>	<u>Versuchsprotokoll</u> <u>Seite</u>
3. Der Einfluß von Lysolecithin		
a) auf Leukocyten	28	47
b) auf Tumorzellen	28	47
4. Der Einfluß von "Dextran"-vor- behandeltem Serum und dem eiweißfreien Extrakt eines sol- chen Serums		
a) auf Leukocyten	31	45
b) auf Tumorzellen	32	46
IV. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	33	
V. <u>Zusammenfassung</u>	33	
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	37	

I. Einleitung

Die Schutzvorrichtungen, mit denen der höhere Organismus sich gegen Infektionen wehrt, sind sowohl spezifischer als auch unspezifischer Natur.

Die unspezifischen Abwehrmechanismen, die im wesentlichen auf der Phagocytose (Metschnikoff) der Granulocyten und der Zellen des reticulo-endothelialen Systems sowie auf der Wirkung des Properdins im Komplement-System des Serums beruhen, sind dadurch charakterisiert, daß sie auf eine Vielfalt von Reizen reagieren und alle beteiligten Regulationsmechanismen (zelluläre, humorale und hormonale) dabei in prinzipiell sehr ähnlicher Weise in Gang gesetzt werden.

Im Gegensatz dazu sind nun die spezifischen Abwehrmechanismen dadurch charakterisiert, daß sie gegen jedes einzelne schädigende Agens (das "Antigen") auch nur ein einziges Abwehrprinzip (den "Antikörper") bilden, das sich mit diesem in spezifischer Weise vereinigt. (Antigen-Antikörper-Reaktion). Allen spezifischen Abwehrvorgängen liegt dieser prinzipielle Mechanismus zugrunde. Seitdem diese Tatsache erkannt und darauf gründend von Forschern wie Buchner (8), Pfeiffer (9), v. Behring (10), Ehrlich (11) und Vordet (18) die humorale Immunitätstheorie begründet worden war, nahm die Erforschung der spezifischen Abwehrmechanismen einen gewaltigen Aufschwung. Die Natur und die Eigenschaften der Antigene, die Natur und der Ursprung der Antikörper, der Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion und deren Folgen wurden Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Die Aufklärung dieser Phänomene konnte in großartiger Weise vorangetrieben werden. Aus der großen Zahl der Forscher sei in diesem Zusammenhang nur auf die Namen von Heidelberger (15, 16, 17), Landsteiner (38), Friedberger (12) und deren Mitarbeiter und Schüler hingewiesen.

Fast gleichzeitig mit der Entdeckung der Antikörper und der Antigen-Antikörper-Reaktionen als wirksame spezifische Schutzmechanismen wurden bereits auch pathogene Wirkungen von Antigen-Antikörper-Reaktionen beschrieben.

Richet (43) und von Pirquet (43) erkannten als erste Vorgänge, bei denen als Folge einer Antigen-Antikörper-Reaktion der Organismus geschädigt oder

getötet wird; Vorgänge, die heute allgemein als "anaphylaktische" und "allergische" Phänomene bekannt sind und grundlegend für die gesamte Allergieforschung geworden sind.

Auch unmittelbare pathogene Wirkungen von Antigen-Antikörper-Reaktionen sind bekannt, z.B. in Fällen, wo Zellen als Antigen funktionieren und bei der Verbindung mit dem entsprechenden Antikörper der Agglutination oder Lyse anheimfallen (pass. Hämagglutination, Absterben von Gewebstransplantaten).

Ein ganz anderer pathogener Mechanismus liegt vor, wenn Zellen durch einen in ihrer Umgebung stattfindenden Antigen-Antikörper-Konflikt in Gegenwart von Komplement geschädigt oder zerstört werden. Daß bei der Mehrzahl der Antigen-Antikörper-Reaktionen das Serum-Komplementsystem beteiligt ist, ist seit den Anfängen der Immunitätsforschung bekannt. Von Bordet und Gengou (44) wurde diese Eigenschaft sogar als Grundlage zu den serologischen Reaktionen benutzt, die allgemein als Komplementbindungsreaktionen bekannt sind und dem Nachweis von Antikörpern dienen. Die bei diesen Reaktionen beobachteten bakteriolytischen und cytolytischen Wirkungen wurden bereits von Ehrlich (45) und Bordet (18) erkannt und dem Komplement zugeschrieben. Beide Forscher haben auch versucht, die Frage zu beantworten, wie C' die Cytolyse bewirkt. Nach der von Ehrlich (45) geäußerten Hypothese sollte es sich dabei um eine über mehrere Stufen verlaufende Reaktion handeln, an deren Ende die Aktivierung eines Fermentes steht, das, an die Zelloberfläche fixiert, diese direkt angreift.

An die C'-Forschung knüpfen sich Namen wie Haurowitz (39), Ecker (40), Pillemer (40) und ihre Schüler sowie Levine (41, 42). Sie konnten nachweisen, daß die Komplementbindungsreaktion in mehreren Stufen abläuft, an deren Ende die Aktivierung eines Fermentes steht, wie Ehrlich es vorausgesehen hatte. Dieses Ferment spaltet aus Serummaterial eine Substanz ab, die die Schädigung oder Lyse der Zellen verursacht.

In Europa sind außer den ungarischen Arbeiten von Hegedus und Grainer kaum Studien über den Wirkungsmechanismus von Komplement unternommen worden.

Erst in letzter Zeit haben Fischer und Mitarbeiter die Frage nach der cyto-

lytischen Wirkung von einer ganz neuen Seite aufgegriffen. Im Gegensatz zu den amerikanischen Autoren, die sich bemühen, die C' -Reaktion in Teilvorgänge zu zerlegen und die dabei beteiligten Komponenten zu isolieren, bemühen sich Fischer und Mitarbeiter um das Endprodukt der immer noch hypothetischen Enzymreaktion. Es gelang ihnen, eine cytolytisch wirksame Substanz im Serum immer dann vermehrt nachzuweisen, wenn in diesem Serum Komplement zuvor verbraucht worden war. Das Komplement-Cytolysin ist nach Fischer und Haupt identisch mit Lysolecithin.

Die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen in Gegenwart von Komplement ausgelösten Zellschädigungen waren zunächst nur für Gewebszellen und Erythrocyten beschrieben (46). 1949 berichteten erstmals C. B. Favour (34, 35), 1950 Schwab (28), 1954 B. H. Waksman und Gaulitz (32), 1955 Hartmann und Hoch (31) auch über Veränderungen von Leukocyten bei Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Alle diese Arbeiten beschränken sich jedoch auf die Darstellung morphologischer Veränderungen der Zellen, wobei einige der Autoren auch auf eine mögliche Beteiligung von Komplement bei diesen Veränderungen hinwiesen.

Die Vermutung liegt nahe, daß den auffälligen morphologischen Veränderungen der Zellen bei Antigen-Antikörper-Reaktionen Veränderungen im Zellstoffwechsel vorausgehen. Überhaupt ist es auffallend, daß bisher nur sehr wenige Stoffwechseluntersuchungen von Zellen bei Antigen-Antikörper-Reaktionen durchgeführt worden sind.

Die erste Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen sollte es nun sein, die morphologischen Veränderungen von Zellen bei Antigen-Antikörper-Reaktionen zu bestätigen und diese Befunde durch Stoffwechseluntersuchungen zu stützen.

Die Studien über die Komplementbeteiligung legten nahe, dabei auch das Verhalten des C' -Systems bei Antigen-Antikörper-Reaktionen zu berücksichtigen und die Lysolecithinhypothese der Komplementwirkung zu stützen. Die Untersuchungen wurden einmal mit Leukocyten durchgeführt, in deren unmittelbarer Umgebung auch natürlicherweise Antigen-Antikörper-Reaktionen ablaufen; und zweitens mit Ascitestumorzellen, die durch Antigen-Antikörper-Reaktionen natürlicherweise nicht betroffen werden.

Methoden

=====

Gewinnung der Leukocyten

Die Leukocyten wurden aus Schweineblut gewonnen. Das Blut wurde aus der Halsschlagader des getöteten Tieres in einer 500 ml-Weithalsflasche aufgefangen, die 20 ml einer 1:20 verd. Heparinlösung enthielt. (Liquemin Roche, in 0,9 % NaCl). Das Vollblut enthielt somit 4 mg % Heparin. 30 Minuten nach der Entnahme wurde 1/3 des Volumens an 3 % Kollidon zugesetzt, um die Sedimentierung zu beschleunigen. (Kollidon K 30 der Bayer-Werke Leverkusen, in 0,9 % NaCl).

Die Sedimentierung geschah in 250 ml-Standzylindern bei einer Temperatur von 4°C, um den Stoffwechsel der Leukocyten vor dem Versuch möglichst niedrig zu halten.

Nach 90 Minuten war eine Trennung von Erythrocyten, Leukocyten und Plasma eingetreten. Die leukocytenreiche Plasmaschicht wurde mit einer spitzen Saugpipette abgehoben und 5 Min. bei 1000 U./Min. zentrifugiert. Verklumpungen der Zellen kamen hierbei nicht vor. Nach Abhebung des Plasmaüberstandes wurde der Bodensatz in einer modifizierten Krebs-Ringer-Lösung suspendiert. (Krebs-Ringerlösung + 24 Teile eines 0,1 mol. Phosphatpuffers + Heparin in einer Endkonz. von 250 E./ml). Die Konzentration der Leukocyten in einer solchen Suspension betrug 60000-75000/mm³, das Verhältnis Leukocyt:Erythrocyt 1:3 bis 1:5.

Gewinnung der Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden aus einem Mäuse-Ascitestumor gewonnen. Dieser Tumor wurde bei uns durch intraperitoneale Überimpfung auf weiße Mäuse gezüchtet. Nach 10-12 Tagen Inokulation konnten dann einer durch Dekapitieren getöteten weißen Maus 10 bis 15 ml Tumorsuspension aus dem Bauchraum entnommen werden. Die benötigte Menge wurde in 2 Wa-Röhrchen pipettiert und bei 1500 U./Min. 5 Minuten zentrifugiert. Der Ascitesüberstand wurde sorgfältig mit einer spitzen Saugpipette abgehoben und der Bodensatz in einer modifizierten Krebs-Ringerlösung suspendiert. (Krebs-Ringerlösung + 24 Teile eines 0,1 mol. Phosphatpuffers).

Die Konzentration der Tumorzellen wurde durch Auszählen in der Zählkammer ermittelt und so gewählt, daß sie in den für die Warburg-Versuche benutzten Inkubationsmedien $25\,000 - 30\,000/\text{mm}^3$ betrug.

Messung des Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffverbrauch wurde manometrisch bestimmt. Die von O. Warburg (4) hierfür angegebene Apparatur und Methode sollen im folgenden kurz beschrieben werden.

Ein Reaktionsgefäß, bestehend aus Hauptraum, Mittelraum und Seitenbirnchen, wird mit einem Manometer verbunden, dessen beide Schenkel bis zu einer bestimmten Marke mit Sperrflüssigkeit angefüllt sind. Der Gasraum, der den Innenraum des Reaktionsgefäßes einschließlich der rechten Manometerkapillare bis zum Spiegel der Sperrflüssigkeit umfaßt, kann nach außen luftdicht abgeschlossen werden. Die linke Manometerkapillare ist oben offen.

Das System ist so angeordnet, daß das die Zellsuspension enthaltende Reaktionsgefäß in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur eintaucht, während das Manometer außen abgelesen werden kann.

Durch ein Rüttelwerk wird das Gefäß im Wasserbad hin- und herbewegt, so daß zwischen der Suspensionsflüssigkeit einerseits und dem im Gasraum befindlichen Gas andererseits Absorptionsgleichgewicht besteht.

Der Sauerstoffverbrauch der jeweils in einem Reaktionsgefäß befindlichen Zellen kann direkt durch Ablesen des Manometerstandes bestimmt werden; hierzu muß allerdings das gleichzeitig von den Zellen ausgeschiedene CO_2 - durch Einsatz von 0,2 ml 20 %iger KOH in den Mittelraum - absorbiert werden.

Um die Menge des verbrauchten Sauerstoffs aus den abgelesenen Manometerwerten bestimmen zu können, muß das Volumen des Gasraumes von Reaktionsgefäß und Manometerkapillare bekannt sein. Es wird bestimmt, indem das Gefäß und die rechte Kapillare bis zu einer bestimmten Marke (150) mit Quecksilber angefüllt werden und hierauf das Gewicht des benötigten

Quecksilbers gemessen wird. Unter Berücksichtigung der Quecksilberdichte, des Luftdrucks und der Temperatur kann das Gesamtvolumen nach der Gleichung

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Gewicht (Hg)}}{\text{spez. Gewicht (Hg) } T, p}$$

bestimmt werden.

Um das Volumen des Gasraumes zu bekommen, muß von dem Gesamtvolumen noch das Flüssigkeitsvolumen der Inkubationsmedien von 3,5 ml - 3 ml im Hauptraum, 0,5 ml im Seitenbirnchen - sowie der Kalilauge von 0,2 ml im Mittelraum abgezogen werden.

Die Gefäßkonstante für den Sauerstoffverbrauch wird mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt :

$$K_{O_2} = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \mathcal{L}}{P_O} \quad \text{wobei}$$

V_G = Volumen des Gasraumes

T = Temperatur des Wasserbades

V_F = Flüssigkeitsvolumen

$\mathcal{L}$ = Löslichkeit des Gases in Wasser bei gegebener Temperatur

P_O = Normaldruck der Sperrflüssigkeit

bedeuten.

Die Sperrflüssigkeit, mit der die Manometerkapillaren angefüllt sind, besteht aus einer thymolblauen Brodie'schen Lösung, deren Normaldruck bei Zimmertemperatur 10 000 mm beträgt.

Thermobarometer. Bei jedem Warburg-Versuch wurde ein mit 3,5 ml aqua dest. beschicktes Reaktionsgefäß als Thermobarometer eingesetzt. Der Sinn des TB. ist, Temperaturschwankungen des Wasserbades und Luftdruckschwankungen während des Versuchs anzuzeigen.

Messung der Milchsäurebildung

Die Milchsäure wurde kolorimetrisch nach der von Barker und Summerson angegebenen Methode bestimmt (3).

Reagenzien :

1. 20 %ige CuSO_4 -Lösung
2. Ca(OH)_2
3. Konz. H_2SO_4 p. a.
4. 4 % CuSO_4 -Lösung in Tropfflasche
5. 1,5 g p-hydroxy-diphenyl im 100 ccm
0,5 % NaOH (in dunkler Flasche kühl aufbewahren)

Standardlösung :

Zinklactat oder 90 %ige Milchsäure

Bestimmung :

1 ml der zu untersuchenden Lösung wird in ein Wa-Röhrchen überführt, mit aqua bidest. auf 5 ml aufgefüllt und 0,5 ml einer 20 %igen CuSO_4 -Lösung hinzugegeben. Ungefähr 0,5 gr. Ca(OH)_2 werden zugesetzt und durch Schütteln verteilt. Das entstandene Kupfer-Calzium-Hydroxyd-Präcipitat entfernt störende Substanzen. Das Präcipitat wird mehrmals aufgeschüttelt und nach 30 Minuten und mehr scharf abzentrifugiert (10 Min. bei 3000 U./Min.).

Je ein ml des völlig präcipitatenfreien Überstandes wird in ein Reagenzglas überführt. Unter Schütteln im Eisbad wird 6 ml vorher eisgekühlte konz. H_2SO_4 langsam hinzugegeben. Das Röhrchen wird 5 Min. in kochenden Wasserbad erhitzt und im Eisbad wieder auf 30°C abgekühlt.

Je 1 Tropfen 4 % CuSO_4 - u. p-hydroxydiphenyl-Lösung wird zugesetzt, sofort heftig geschüttelt und anschließend 30 Min. bei 28-30°C im Wasserbad inkubiert.

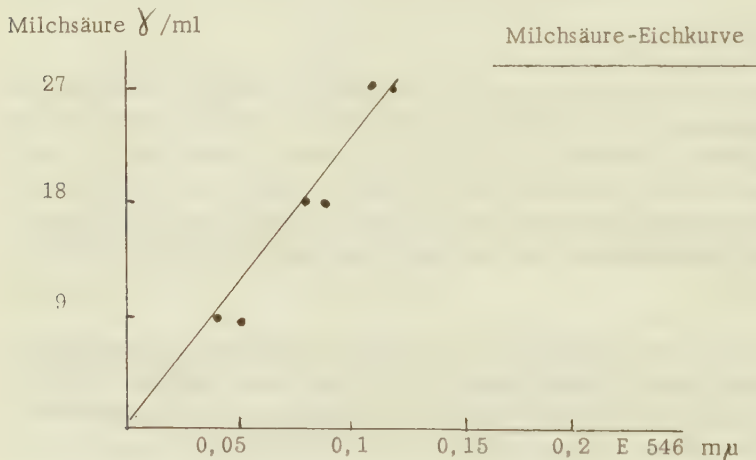
Durch das Kühlen und Schütteln wird lokales Erhitzen vermieden, welches falsche Ergebnisse (z. B. Weiteroxydation von Acetaldehyd zu Essigsäure) verursachen kann.

Dann wird das Röhrchen 90 sec. im kochenden Wasserbad erhitzt, im Eisbad auf 30° C abgekühlt und die zu untersuchende Lösung in eine Photometer-Küvette überführt. Die Messung am Photometer erfolgte gegen einen Leerwert bei 546 m μ . (Eppendorf-Filter).

Die Berechnung der Milchsäure erfolgte mit Hilfe einer Milchsäure-Eichkurve.

Zur Aufstellung einer solchen Eichkurve wird 90 % Milchsäure 1:100 000 verdünnt. Je 0,5, 1 und 3 ml der Verdünnung werden in Wa-Röhrchen überführt und gemäß den oben genannten Durchführungsbestimmungen behandelt. Mit dieser Methode ist es möglich, 3-30 gamma Milchsäure mit einer Genauigkeit von $\pm$ 0,4 gamma nachzuweisen.

Für die Eichkurve standen, entsprechend des Ansatzes, drei Milchsäurewerte zur Verfügung, nämlich 9, 18 und 27 gamma.



Alle bei der Milchsäurebestimmung benutzten Glassachen wurden in Chromschwefelsäure gereinigt, gewässert, einige Min. in 0,2 n NaOH gelegt, wieder gründlich gewässert und zum Schluß mit aqua bidest. gespült.

Bestimmung von Serum-Komplement

Das im Serum enthaltene Gesamtkomplement wurde nach der von Kabat und Mayer angegebenen Methode bestimmt (46), und die Einheiten wurden in 50 % Hämolysewerten ausgedrückt. Da für meine Untersuchungen die Kenntnis des Verhaltens von Gesamtkomplement (C') ausreichte, wurde auch dieses nur bestimmt; die Veränderungen der einzelnen Komplementfaktoren $C'_1 - C'_4$ wurden also nicht berücksichtigt.

Von 0,2 ml des zu untersuchenden Serums wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,3 ml einer 0,9 % NaCl-Lösung und 1 ml einer Suspension von sensibilisierten Hammelerythrocyten zugesetzt. Die Ansätze wurden 30 Min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert und anschließend zentrifugiert. Als Maß für den Komplementabfall diente die in den Versuchsüberständen eingetretene Hämolyse. Sie wurde gegen den Vergleichswert einer 50 %-Hämolyse abgelesen.

Bestimmung der lytischen Aktivität von Serumextrakten

Die lytische Aktivität von Serumextrakten wurde nach H. Fischer und I. Haupt (47) auf folgende Weise ermittelt: Von den in Frage kommenden Extrakten (über die Herstellung siehe Seite 17) wurden geometrische Verdünnungsreihen hergestellt. Zu 1 ml jeder Verdünnungsstufe wurde 0,1 ml einer 5 %igen Erythrocytensuspension zugesetzt (frische Humanerythrocyten in 0,9 % NaCl), und die Ansätze wurden 6 Stunden bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Die nach dieser Zeit bis zu einer bestimmten Verdünnungsstufe vollständig oder teilweise eingetretene Hämolyse wurde als Maß für die lytische Aktivität gewertet. Die Hämolyse wurde gegen den Vergleichswert einer 50 %-Hämolyse abgelesen.

Herstellung und Zusammensetzung der Inkubationsmedien

1.) Die Salzlösungen

Stammlösungen :

1. 0,9 % NaCl (0,154 M)
2. 1,15 % KCl (0,154 M)
3. 1,22 % CaCl_2 (0,110 M)
4. 2,11 % KH_2PO_4 (0,154 M)
5. 3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,154 M)
6. 0,1 M Phosphat-Puffer, $\text{pH } 7,4$
(17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 20 ccm
1 n HCl ad 1 Liter)

Die Krebs-Ringer-Lösung wird aus folgenden Mengen der oben angeführten Stammlösungen bereitet :

- | | |
|------------------|----|
| 100 Teile Lösung | 1. |
| 4 Teile Lösung | 2. |
| 3 Teile Lösung | 3. |
| 1 Teil Lösung | 4. |
| 1 Teil Lösung | 5. |

Die Krebs-Ringer-Doppelphosphat-Lösung setzt sich aus Krebs-Ringer-Lösung und 24 Teilen der Lösung 6. zusammen.

2.) Die Immunseren

Zu 1 ml aktiven Serums (Human-, Meerschweinchen- oder Schweineserum) werden 0,5 ml einer 5 mg %igen Lösung von Rinderalbumin (Serumalbumin vom Rind, -trocken "reinst"- Op.Nr. 23356, Beringswerke Marburg, in 0,9 % NaCl) und 0,5 ml einer Lösung von Antirinderserum (Anti-Rinderserum vom Kaninchen Op.Nr. 205 u. 206 der Behringwerke Marburg, 1:10 verd. in 0,9 % NaCl) hinzugegeben und 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde evtl. entstandenes Präcipitat scharf abzentrifugiert. (10 Min. bei 3000 U./Min.).

3.) Die eiweißfreien Serumextrakte

Zum aktiven Serum und zu dem durch Anngen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Serum wird die 7-fache Menge Methanol zugesetzt. Das gefällte Eiweiß wird abfiltriert; das eiweißfreie Filtrat wird auf das ursprüngliche Volumen eingeeengt und neutralisiert.

4.) Lysolecithin

Lysolecithin (Präp. 2367 B IV v. Dr. Hirt, Bern) wird auf der Präzisionswaage abgewogen, in Chloroform gelöst und von der Lösung eine geometr. Verdünnungsreihe hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen werden bis fast zur Trockne wieder eingeeengt. Das als feiner Film an der Wand der Röhren niedergeschlagene Lysolecithin wird in Krebs-Ringer-Doppelphosphatlösung unter Zusatz von 2 Tropfen absol. Alkohol suspendiert.

5.) Dextran

Zu 1 ml aktivem Serum werden 5 mg Dextran zugesetzt und unter Schütteln 60 Min. bei 37° C inkubiert. Danach wird durch scharfes Abzentrifugieren (10 Min. bei 3000 U./Min.) das Dextran vom Serum wieder getrennt. Die eiweißfreien Extrakte aus Dextran-vorbehandeltem Serum sind nach der für die übrigen Serumextrakte angegebenen Methode hergestellt worden. (Siehe 3.).

E r g e b n i s s e : =====

Alle in meiner Arbeit angegebenen Werte wurden in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Versuche wurden an verschiedenen Tagen mit stets frischen Zellen wiederholt. Als Bezugsgröße wurde nach dem Vorschlag von B e c k und V a l e n t i n e (6) die Zellzahl gewählt und die bei der Messung des Sauerstoffverbrauches und der Milchsäurebildung gefundenen Werte umgerechnet auf mM / 10¹⁰ Z / Std.

Aus einer Anzahl von Versuchen mit gleichsinnigen Ergebnissen wird je ein Versuch näher erörtert, während die übrigen Experimente im Versuchsprotokoll mit Ansatz und Ergebnissen zu finden sind.

1.) Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Stoffwechsel von Leukocyten

a) Wiedergabe der Ergebnisse eines typischen Versuches.

Versuchsansätze :

Alle Versuchsansätze waren gleichartig beschickt mit 1 ml einer Suspension von Schweineleukocyten und mit 1 ml Krebs-Ringer-Doppelphosphatlösung. Außerdem wurden hinzugesetzt :

zum Ansatz 1 : 1 ml Humanserum ^{+) (Serum-Kontrolle)}

zum Ansatz 2 : 1 ml eiweißfreier Extrakt aus aktivem Humanserum
(Aktivserum-Extrakt)

zum Ansatz 3 : 1 ml Humanserum, in dem zuvor während 120 Min. eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hatte und das anschließend bei 56° C inaktiviert wurde (AAK-Serum)

zum Ansatz 4 : 1 ml eiweißfreier Extrakt aus Humanserum, in dem zuvor während 120 Min. eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattgefunden hatte (AAK-Serum-Extrakt).

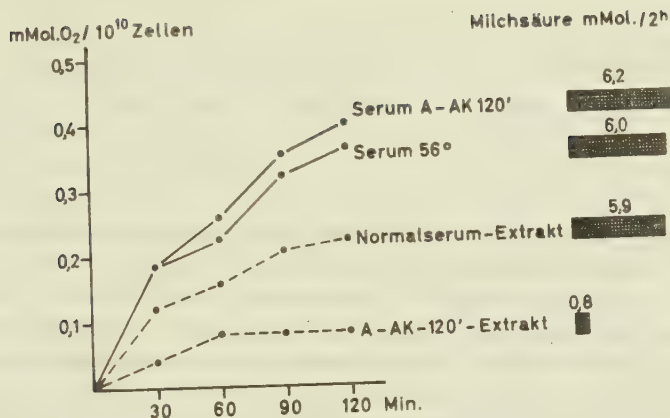
Ergebnisse :

Sauerstoffverbrauch und Milchsäurebildung von Leukocyten

(in mM/ 10¹⁰ Z / 2 Std.)

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch	Milchsäurebildung
Serum (Kontrolle)	0,48	6,0
AAK-Serum	0,61	6,2
Aktivserum-Extrakt	0,52	5,9
AAK-Serum-Extrakt	0,15	0,8

+) Humanserum enthält einen natürlichen Antikörper gegen Schweineleukocyten. Es wurde deshalb vor dem Versuch durch Erhitzen bei 56°C inaktiviert.



Atmung und Milchsäurebildung von Schweineleukocyten in AAK-Serum sowie in eiweißfreien Filtraten von Normal- bzw. von mit AAK vorbehandeltem Serum.

Beispiel eines typischen Versuches.

Mikroskopische Untersuchung der Leukocyten nach dem Versuch

Serum (Kontrolle)	}	Zellen sichtbar nicht verändert
AAK-Serum		
Aktiv-Serum-Extrakt		
AAK-Serum-Extrakt	:	Zellen fast vollständig zerstört, Zellmembranen aufgelöst; Zellkerne zum Teil noch erhalten, zum Teil aber auch aufgelöst. Präparat von Zelltrümmern übersät.

C'-Bestimmung vor dem Versuch

Serum (Kontrolle)	185 E
AAK-Serum	5 E

Lytische Aktivität der Serumextrakte vor dem Versuch

Verdünnung	:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Aktivserum-Extrakt	:	++	++	(+)	-	-
Extrakt aus AAK-Serum	:	++	++	++	++	-

Der Sauerstoffverbrauch der Leukocyten ist in einem durch Antigen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Serum leicht gesteigert; die Milchsäurebildung schwankt im Bereich der Norm oder ist etwas erniedrigt. Das gleiche Stoffwechselverhalten zeigen Leukocyten, die im eiweißfreien Extrakt aus Aktivserum inkubiert werden. Bei der Inkubation im eiweißfreien Extrakt eines durch Antigen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Serums jedoch wird sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Glykose exzessiv gehemmt.

Die mikroskopische Untersuchung nach dem Versuch ergab, daß entsprechend den Stoffwechselveränderungen auch morphologische Veränderungen an den Zellen eingetreten waren. So konnte an den Leukocyten, deren Stoffwechsel sehr stark gehemmt worden war, nach dem Versuch eine große Schädigung oder sogar vollständige Zerstörung der Zellen beobachtet werden. Die in ihrem Stoffwechsel nicht gehemmten Zellen blieben auch morphologisch unverändert.

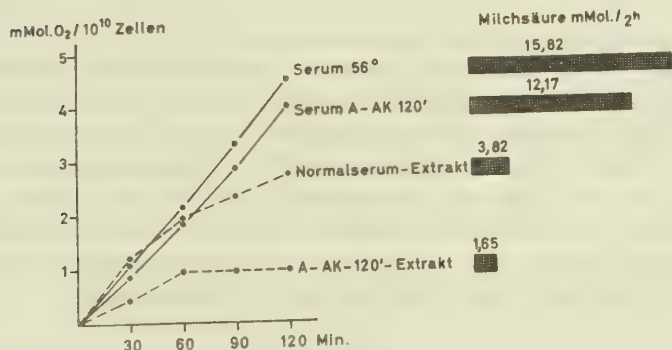
Gleichzeitig mit den Stoffwechseluntersuchungen und den morphologischen Untersuchungen wurde auch das Verhalten von Komplement in den benutzten Sera und das Verhalten der lytischen Aktivität in den eiweißfreien Serumextrakten untersucht. Exakte Bestimmungen von Gesamtkomplement vor dem Versuch ergaben, daß der C'-Titer in den durch Antigen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Sera gegenüber unbehandelten Sera um 95 - 100 % vermindert war. Die lytische Aktivität der eiweißfreien Extrakte aus den durch Antigen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Sera war gegenüber den Extrakten aus unbehandelten Sera um das vier- bis achtfache angestiegen.

2.) Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Stoffwechsel von Ascites-Tumorzellen

Wenn die soeben bei den Leukocyten beschriebenen Stoffwechselveränderungen und morphologischen Veränderungen allein durch die bei der Antigen-Antikörper-Reaktion im Serum vorgehenden Veränderungen bedingt sind, müßten auch andere Zellen unter den gleichen Versuchsbedingungen ähnliche Veränderungen zeigen. Wir haben deshalb die Experimente mit Mäuse-Ascitestumorzellen - Zellen also, die sich in vielfacher Weise von Blutleukocyten unterscheiden - unter den gleichen Versuchsbedingungen wiederholt.

Ergebnisse : Sauerstoffverbrauch und Milchsäurebildung von Mäuse-Ascitestumorzellen (in m Mol / 10^{10} Zellen / 2 Std.)

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch	Milchsäurebildung
56°-Serum	4,50	15,82
AAK-120'-Serum	4,04	12,17
Aktivserum-Extrakt	2,70	3,82
AAK-120'-Serum-Extrakt	0,96	1,95



Atmung und Milchsäurebildung von Ascitestumorzellen der Maus in AAK-Serum sowie in eiweißfreien Filtraten von Normal- bzw. von mit AAK vorbehandeltem Serum. Beispiel eines typischen Versuches.

Mikroskopische Untersuchung der Tumorzellen nach dem Versuch

Serum (Kontrolle)	:	Zellen nicht sichtbar verändert
AAK-Serum	:	Zellen zum Teil gequollen, etwas deformiert
Aktiv-Serum-Extrakt	:	Zellen zum Teil gequollen, Zellgrenzen verwaschen
AAK-Serum-Extrakt	:	Zellen hochgradig gequollen, zum größeren Teil zerstört, sehr viele Zelltrümmer

C'-Bestimmung vor dem Versuch

Serum (Kontrolle)	160 E
AAK-Serum	0 E

Lytische Aktivität der Serumextrakte vor dem Versuch

Verdünnung	:	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Aktivserum-Extrakt	:	++	++	-	-	-
Extrakt aus AAK-Serum	:	++	++	++	++	-

Der Stoffwechsel von Ascites-Tumorzellen verhält sich unter den gleichen Versuchsbedingungen gegenüber den Leukocyten teils unterschiedlich, teils gleichsinnig. Bei den Tumorzellen sind der Sauerstoffverbrauch und die Glykolyse in allen Versuchsansätzen gegenüber dem Kontrollserum erniedrigt, und zwar in steigendem Maße in der Reihenfolge: AAK-Serum, Aktivserum-Extrakt, AAK-Serum-Extrakt. Die Stoffwechselhemmung der Tumorzellen im AAK-Serum und Aktivserum-Extrakt steht im Gegensatz zu der Steigerung des Stoffwechsels in diesen Ansätzen bei den Leukocyten. Die ausgeprägte Hemmung des Stoffwechsels bei Inkubation im AAK-Serum-Extrakt dagegen ist bei Leukocyten und Tumorzellen gleich.

Die mikroskopische Untersuchung der Tumorzellen nach dem Versuch zeigte in der Reihenfolge: AAK-Serum, Aktivserum-Extrakt, AAK-Serum-Extrakt eine zunehmende Schädigung der Zellen und damit eine völlige Übereinstimmung der morphologischen Veränderungen mit den Stoffwechselveränderungen.

Der C'-Titer der benutzten Sera und die lytische Aktivität der eiweißfreien Serumextrakte waren mit großer Annäherung dieselben wie bei den Experimenten mit Leukocyten.

Die für die bisherigen Experimente gewählte Versuchsanordnung war noch sehr unphysiologisch : Die Antigen-Antikörper-Reaktion fand erstens vor dem Versuch statt und zweitens in einem den Zellen fremden Serum, das nach Ablauf der AAK-Reaktion inaktiviert werden mußte. In den folgenden Experimenten konnten diese Mängel beseitigt werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ließen wir während des Versuches ablaufen, und die Leukocyten wurden in aktivem Schweineserum und die Tumorzellen in vorher getestetem, aktivem Meerschweinchenserum inkubiert.

3.) Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen während ihres Ablaufs auf den Stoffwechsel von Leukocyten und Tumorzellen

Wiedergabe eines typischen Versuches.

Versuchsansätze :

Jeder Versuchsansatz enthielt im Hauptraum des Reaktionsgefäßes 1 ml Leukocyten- bzw. Tumorzellensuspension und 1 ml aktives Schweineserum bzw. Meerschweinchenserum.

Es wurden dazugesetzt :

zum Ansatz 1 : 1 ml Krebs-Ringer-Doppelphosphat-Lösung (im folgenden als KRDP-Lösung abgekürzt).

Im Seitenbirnchen befand sich 0,5 ml KRDP-Lösung (Kontrollserum).

zum Ansatz 2 : 0,5 ml Rinderalbumin als Antigen und 0,5 ml KRDP-Lösung.

Im Seitenbirnchen befand sich 0,5 ml KRDP-Lösung (Serum und Antigen).

zum Ansatz 3 : 1 ml KRDP-Lösung.

Im Seitenbirnchen befand sich 0,5 ml Antirinderserum als Antikörper (Serum und Antikörper)

zum Ansatz 4 : 0,5 ml Rinderalbumin und 0,5 ml KRDP-Lösung.

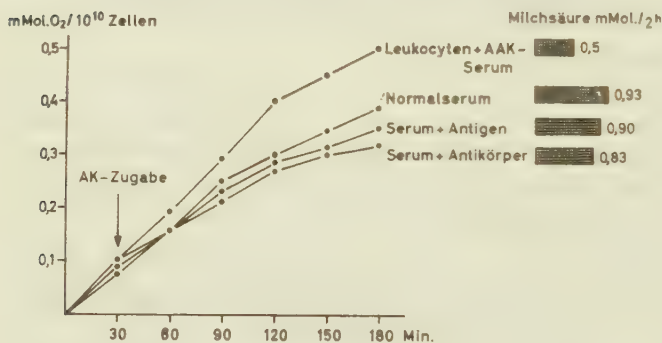
Im Seitenbirnchen befand sich 0,5 ml Antirinderserum (Serum und AAK).

Die Lösungen aus dem Seitenbirnchen wurden 30 Minuten nach Beginn des Versuches in den Hauptraum zugekippt.

Ergebnisse

Sauerstoffverbrauch und Milchsäurebildung von Leukocyten bei ablaufen-
der Antigen-Antikörper-Reaktion im Serum ($\text{mM}/10^{10}$ Z/ 2 3/4 Std.)

Inkubationsmedium	O_2 -Verbrauch	Milchsäurebildung
Leuko + Serum (Kontrolle)	0,38	0,93
Leuko + Serum + Antigen	0,35	0,90
Leuko + Serum + Antikörper	0,33	0,83
Leuko + Serum + AAK	0,50	0,50

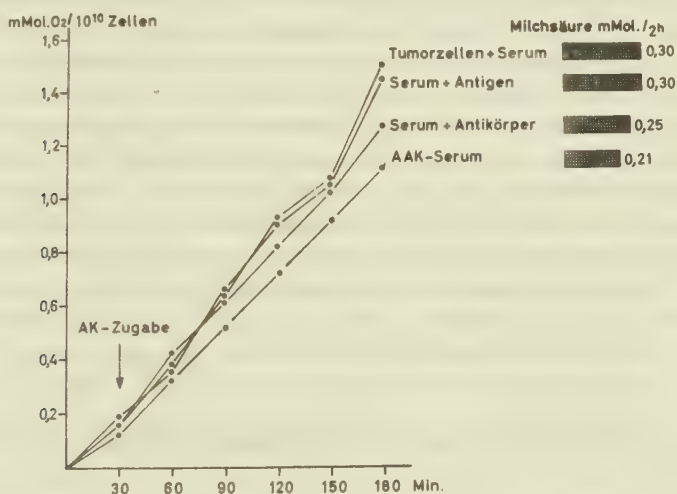


Atmung und Milchsäurebildung von Schweineleukocyten während des Ablaufes einer Antigen-Antikörper-Reaktion in Serum.

Beispiel eines typischen Versuches.

Sauerstoffverbrauch und Milchsäurebildung von Tumorzellen bei ablaufender Antigen-Antikörper-Reaktion im Serum (mM/10¹⁰ Z/ 2 3/4 Std.)

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch	Milchsäurebildung
Tumor-Z. + Serum (Kontrolle)	1, 50	0, 30
Tumor-Z. + Serum + Antigen	1, 27	0, 30
Tumor-Z. + Serum + Antikörper	1, 48	0, 25
Tumor-Z. + Serum + AAK	1, 16	0, 21



Atmung und Milchsäurebildung von Ascitestumorzellen der Maus während des Ablaufes einer Antigen-Antikörper-Reaktion in Serum.

Beispiel eines typischen Versuches.

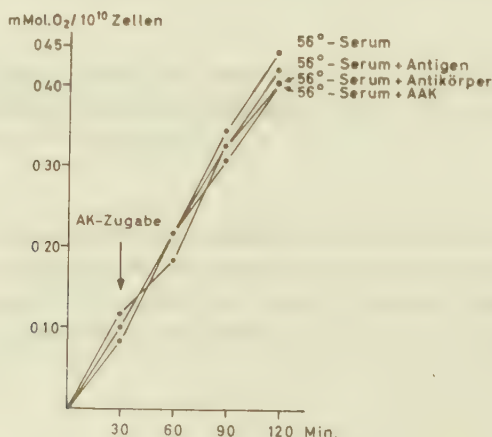
Der Sauerstoffverbrauch von Leukocyten wird durch eine im aktiven Serum stattfindende Antigen-Antikörper-Reaktion deutlich gesteigert; die Steigerung setzt ungefähr 30 Min. nach Beginn der Reaktion ein und hält für die Dauer des Versuches an. Die Milchsäurebildung ist etwas erniedrigt.

Im Gegensatz dazu werden sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Milchsäurebildung von Tumorzellen bei Inkubation in aktivem Meer-schweinchenserum durch eine darin stattfindende Antigen-Antikörper-Reaktion erniedrigt. Die Verminderung des Sauerstoffverbrauches setzt auch ungefähr 30 Min. nach Beginn der Antigen-Antikörper-Reaktion ein und hält ebenfalls für die Dauer des Versuches an.

Die zunächst unter unphysiologischeren Bedingungen erhaltenen Ergebnisse entsprechen somit denen, die mit der verbesserten Versuchsanordnung erzielt wurden.

Außerdem wurde mit der verbesserten Versuchsanordnung noch ein weiteres wichtiges Ergebnis erzielt. Der Sauerstoffverbrauch und die Milchsäurebildung der Tumorzellen und Leukocyten waren in den Ansätzen Serum + Antigen und Serum + Antikörper gegenüber dem Kontrollansatz unverändert. Diese Tatsache schließt nämlich die Möglichkeit aus, daß Serum + Antigen oder Serum + Antikörper allein die Stoffwechselveränderungen der Zellen verursachen könnten. Die Möglichkeit, daß auch ein isolierter Antigen-Antikörper-Komplex für die Stoffwechselveränderungen verantwortlich sein könnte, konnte ausgeschlossen werden durch Versuche, in denen das bei unseren Antigen-Antikörper-Reaktionen benutzte Antigen-Antikörper-System zu inaktiviertem Serum zugesetzt wurde. Dabei wurden Stoffwechselunterschiede gegenüber dem Kontrollserum nicht beobachtet.

Leukocytenstoffwechsel bei ablaufender Antigen-Antikörper-Reaktion in inaktiviertem Serum



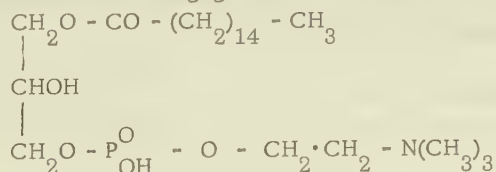
Somit komme ich zu dem Schluß, daß die beschriebenen Stoffwechseleränderungen und morphologischen Veränderungen der Leukocyten und Tumorzellen durch eine in aktivem Serum stattfindende Antigen-Antikörper-Reaktion verursacht werden.

Die Frage, auf welche Weise durch das Zusammenwirken von Antigen-Antikörper-Reaktion und Aktivserum die Stoffwechseleränderungen hervorgerufen werden, soll im folgenden erörtert werden.

Seit längerer Zeit schon ist bekannt, daß bei der Mehrzahl der in aktivem Serum ablaufenden Antigen-Antikörper-Reaktionen das Serum-Komplementsystem beeinflusst wird. Bei unseren Untersuchungen fanden wir in den durch Antigen-Antikörper-Reaktion vorbehandelten Sera einen Komplementabfall von 95-100 %. Sie wiesen im Gegensatz zu unbehandelten Sera eine leichte cytolysierende Wirkung auf. Der Unterschied wurde deutlicher, wenn an Stelle von Vollsera die eiweißfreien Extrakte von Aktivserum und AAK-Serum miteinander verglichen wurden. In solchen Extrakten aus AAK-Serum war die cytolysierende Wirkung um das 6-8fache größer als in solchen aus Aktivserum. H. Fischer und I. Haupt (47) haben versucht, das in AAK-Sera und in deren eiweißfreien Extrakten enthaltene lytische Prinzip näher zu charakterisieren. Sie konnten wahrscheinlich machen, daß es sich dabei um die Lyso-Verbindung eines Phospholipids, vermutlich um Lysolecithin handelt.

Wenn es richtig ist, daß durch die Antigen-Antikörper-Reaktion C' verbraucht und im entsprechenden Maße Lysolecithin freigesetzt wird, und wenn weiterhin das Lysolecithin tatsächlich das lytische Prinzip ist, liegt die Vermutung nahe, daß auch die durch Antigen-Antikörper-Reaktion erzeugten Stoffwechseleränderungen auf die Wirkung von Lysolecithin zurückzuführen sind.

Es wurde deshalb der Stoffwechsel von Leukocyten und Tumorzellen unter Zugabe von steigenden Konzentrationen eines synthetischen Lysolecithins untersucht. Als solches stand mir ein Präparat von Dr. Hirt, Bern, zur Verfügung, dessen Formel hier wiedergegeben sei :

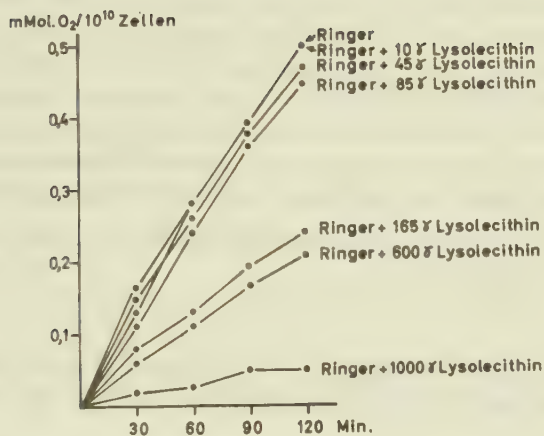


Stoffwechsel von Leukocyten bei Zugabe steigender Konzentrationen von Lysolecithin

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/ 2 Std.)
Leukocyten + Ringer (Kontrolle)	0,18
Leukocyten + 12 γ Lysolecithin/ml	0,17
Leukocyten + 40 γ " "	0,17
Leukocyten + 80 γ " "	0,20
Leukocyten + 165 γ " "	0,14

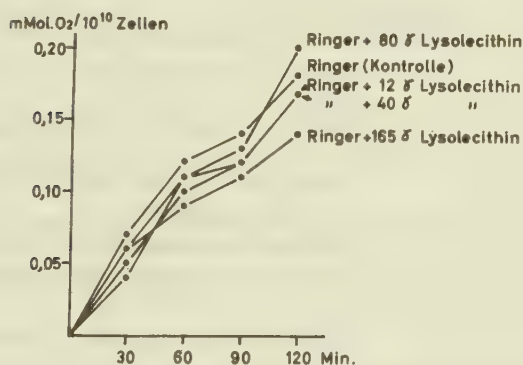
Stoffwechsel von Tumorzellen bei Zugabe steigender Konzentrationen von Lysolecithin

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/ 2 Std.)
Tumorzellen + Ringer (Kontrolle)	0,50
Tumorzellen + 10 γ Lysolecithin/ml	0,50
Tumorzellen + 45 γ " "	0,49
Tumorzellen + 85 γ " "	0,46
Tumorzellen + 165 γ " "	0,24
Tumorzellen + 600 γ " "	0,20
Tumorzellen + 1000 γ " "	0,05



Atmung von Ascitestumorzellen der Maus in steigenden Konzentrationen von Lysolecithin.

Beispiel eines typischen Versuches.



Atmung von Schweineleukocyten in steigenden Konzentrationen von Lysolecithin.

Beispiel eines typischen Versuches.

Die Versuche zeigen, daß der Sauerstoffverbrauch von Tumorzellen in dem Maße vermindert wird, in dem die Konzentration des zugesetzten Lysolecithins ansteigt. Bei den Leukocyten dagegen tritt zunächst eine Stoffwechselsteigerung ein (bei Konzentrationen zwischen 80-120 ‰ Lysolecithin/ml) und erst von Konzentrationen über 120 ‰ an eine - den Tumorzellen entsprechende - kontinuierliche Verminderung des Stoffwechsels. Die Stoffwechselveränderungen zeigen somit eine auffallende Parallelität mit denen, die durch AAK-Sera und deren eiweißfreie Extrakte verursacht werden.

Dieselbe Parallelität zeigte sich auch bei dem Vergleich der mikroskopischen Befunde.

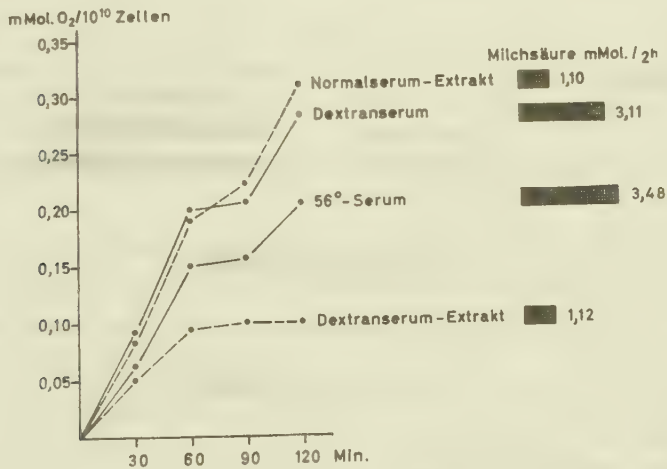
Morphologische Veränderungen von Leukocyten bei steigender Konzentration von Lysolecithin (Inkubationsdauer 1 Std. bei 37⁰ C)

Lysolecithin-Konzentration /ml	Mikroskopischer Befund
1000	Vollständige Zerstörung der Leukocyten; Zelldetritus
500	Leukocyten zur Mehrheit zerstört, Zelldetritus; vereinzelt noch erhaltene, hochgradig gequollene Zellen
250	Leukocyten zum Teil zerstört, zum Teil gequollen
125	Leukocyten zum geringeren Teil zerstört, zur Mehrzahl gequollen
65	Leukocyten geringgradig zerstört, zur Mehrzahl gequollen, vereinzelt unveränderte Zellen
weniger als 50	Leukocyten sichtbar nicht verändert

Außer durch Zugabe von reinem Lysolecithin konnten völlig entsprechende Stoffwechselveränderungen und morphologische Veränderungen durch "Dextran"-vorbehandelte Sera und deren eiweißfreie Extrakte erzielt werden.

Stoffwechsel von Leukocyten in "Dextran"-vorbehandelten Medien

Inkubationsmedium	Sauerstoffverbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/2 Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/2 Std.)
Leukocyten + Serum (Kontrolle)	0,21	3,48
Leukocyten + Dextranserum	0,28	3,11
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,34	1,10
Leukocyten+Dextranserum- Extrakt	0,10	1,12

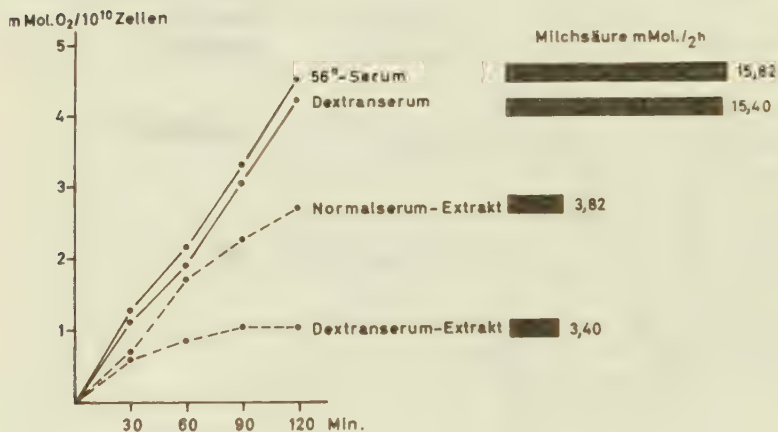


Atmung und Milchsäurebildung von Schweineleukocyten in Dextran-Serum sowie in eiweißfreien Filtraten von Normal- bzw. von mit Dextran vorbehandeltem Serum.

Beispiel eines typischen Versuches.

Stoffwechsel von Tumorzellen in "Dextran"-vorbehandelten Medien

Inkubationsmedium	O ₂ -Verbrauch mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/2 Std.)
Tumorzellen + Serum (Kontrolle)	4,50	15,82
Tumorzellen+Dextranserum	4,30	15,40
Tumorzellen+Aktivserum- Extrakt	2,71	3,82
Tumorzellen+Dextranserum- Extrakt	1,05	3,40



Atmung und Milchsäurebildung von Ascitestumorzellen der Maus in Dex-
tran-Serum sowie in eiweißfreien Filtraten von Normal- bzw. von mit
Dextran vorbehandeltem Serum.

Beispiel eines typischen Versuches.

IV. Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse

=====

Bevor ich auf die Erörterung der Ergebnisse eingehe, muß vorausgeschickt werden, daß die Bedingungen, unter denen sie erhalten wurden, in mancher Hinsicht unphysiologisch waren.

So ließ sich erstens bei der Verwendung von Serum als Inkubationsmedium nicht vermeiden, daß der pH-Wert im Laufe des Experiments regelmäßig um 0,3-0,8 Einheiten anstieg. Ursache des Anstiegs war die in der Mittelkanne des Reaktionsgefäßes befindliche KOH, die nicht nur die von den Zellen ausgeschiedene CO_2 , sondern auch die im Serum normalerweise gelöste CO_2 quantitativ absorbiert. Um den pH-Anstieg nicht noch zu vergrößern, mußten deshalb die benutzten Sera im Verhältnis 1:3 verdünnt werden.

Zweitens wurden alle Versuche in vitro ausgeführt. Die Frage, inwieweit die in vitro gefundenen Ergebnisse auf die Verhältnisse im lebenden Organismus übertragen werden können, muß hier offen gelassen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse lassen sich folgende Aussagen machen :

1. Der Stoffwechsel und die Morphologie von Leukocyten und Tumorzellen werden durch Antigen-Antikörper-Reaktionen tatsächlich verändert.
2. Die morphologischen Veränderungen und Stoffwechselveränderungen entsprechen einander weitgehend.
3. Die Art der Beeinflussung ist für Leukocyten und Tumorzellen unterschiedlich bei Inkubation in AAK-Sera : Leukocyten erfahren eine Stoffwechselsteigerung, Tumorzellen eine Stoffwechselverminderung. Die Beeinflussung ist gleich bei Inkubation in eiweißfreien Extrakten aus AAK-Sera : Leukocyten und Tumorzellen werden in ihrem Stoffwechsel ausgeprägt gehemmt.
4. Dieselben durch AAK-Sera und deren eiweißfreien Extrakte verursachten Stoffwechselveränderungen können für Tumorzellen und Leukocyten in entsprechender Weise hervorgerufen werden
 - a) durch Inkubation in "Dextran"-vorbehandelten Sera und deren eiweißfreie Extrakte und
 - b) durch Inkubation in Medien, denen Lysolecithin in bestimmten Konzentrationen zugesetzt wird.

5. Die bei Inkubation in Serum gefundenen Stoffwechselveränderungen und morphologischen Veränderungen für Leukocyten und Tumorzellen können nur in aktivem Serum hervorgerufen werden.

6. Das durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion oder durch "Dextran" veränderte aktive Serum weist einen großen Abfall von Serumkomplement und einen Anstieg seiner lytischen Aktivität auf.

Die Ursache für die gefundenen Zellveränderungen ist der Anstieg der lytischen Aktivität. Die Tatsache, daß die Stoffwechselveränderungen von so unterschiedlichen Zellen wie Leukocyten und Tumorzellen bei Inkubation in so verschiedenen Medien wie AAK-Serum-Extrakt, "Dextran"-Serum-Extrakt und Lysolecithin weitgehend gleichartig sind, läßt meiner Ansicht nach keine andere Erklärung zu.

Das der lytischen Aktivität zugrunde liegende Substrat ist sehr wahrscheinlich Lysolecithin. Diese Hypothese, die erstmals von Bergenhem und Fahraeus (24), geäußert, von Isliker (25) neuerdings wieder diskutiert und von H. Fischer und I. Haupt (21) als bewiesen angesehen wird, konnte durch meine Ergebnisse bestätigt werden.

Fraglich ist jedoch, ob das von mir verwendete synthetische Lysolecithin mit dem bei einer Antigen-Antikörper-Reaktion in Serum freiwerdenden Lysolecithin identisch ist.

H. Fischer und I. Haupt (47) haben mitgeteilt, daß bereits wenige γ Lysolecithin ausreichen sollen, um Stoffwechselveränderungen und morphologische Veränderungen von dem Ausmaß zu bewirken, wie ich sie in meinen Experimenten erhalten habe. Die von mir benötigten Mengen des synthetischen Lysolecithins sind jedoch mindestens eine bis zwei Zehnerpotenzen größer. Als Ursache für diese Diskrepanz kann möglicherweise auch die Schwierigkeit angesehen werden, synthetisches Lysolecithin in einem physiologischen Medium in Lösung zu bringen. Bei den von mir benutzten Lysolecithinsuspensionen konnte keine genaue Aussage darüber gemacht werden, wieviel von der jeweils pro Versuchsansatz verwendeten Menge suspendiert und wieviel tatsächlich gelöst war. Die Lösungsverhältnisse von synthetischem Lysolecithin in physiologischen Medien festzustellen, überstieg den Rahmen dieser Arbeit.

Nach Beendigung meiner Experimente sind mir Veröffentlichungen bekannt geworden (50), aus denen hervorgeht, daß reines Lysolecithin in physiologischer NaCl-Lösung löslich ist und daß schon bei geringer Verunreinigung,

z.B. durch Lecithin, die Löslichkeit in NaCl stark vermindert oder völlig aufgehoben ist. Es war mir nicht möglich, das von mir verwendete synthetische Präparat - welches an anderer Stelle (S. 29) genauer beschrieben ist - auf seinen Reinheitsgrad hin nachzuprüfen, so daß ich nachträglich in Frage stellen muß, ob tatsächlich mit ganz reinem Lysolecithin gearbeitet worden ist.

Neueste Arbeiten, insbesondere von F. Jung (48) und Robinson und L. Saunders (50) haben die Problematik der Löslichkeit von Lysolecithin noch vergrößert. Hiernach soll sich Lysolecithin nur in sehr verdünnten Lösungen in echter molekularer Lösung befinden. Von einer bestimmten Grenzkonzentration an, die für Lysolecithin ungefähr bei 10^{-5} g/ml liegt, lagern sich die Moleküle zu kolloidalen Gebilden zusammen, die als Micellen bezeichnet werden. Die lytische Aktivität des in Micellarverbänden vorliegenden Lysolecithins ist jedoch sehr stark vermindert oder überhaupt nicht wirksam.

Die von mir benutzten Lysolecithin-Konzentrationen lagen in einem Bereich von 10^{-6} g/ml und 10^{-3} g/ml; zum größeren Teil also oberhalb der kritischen Micellarkonzentration des Lysolecithins. Eine eindeutige proportionale Abhängigkeit zwischen Lysolecithinkonzentration und Sauerstoffverbrauch der Zellen ergab sich bei mir erst bei einer Konzentration von 10^{-4} g/ml an aufwärts. Bei dieser Konzentration liegt Lysolecithin bereits in Micellarverbänden vor. Daß trotzdem eine zunehmende lytische Aktivität - gemessen an der Atmungsverminderung der Zellen - eintrat, ließe sich erklären, wenn man annimmt, daß zwar die Micelle selbst als Lyticum nur wenig wirksam ist, jedoch laufend aktives Lysolecithin nachzuliefern vermag, wenn die Adsorption an die Zellen die Konzentration des in echter Lösung befindlichen Lysolecithins zu senken beginnt.

Zum Schluß sei noch die Möglichkeit angedeutet, die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf allergische Phänomene zu interpretieren. Es ist heute die allgemeine Auffassung, daß die allergischen Reaktionen u. a. durch die plötzliche Freisetzung von Histamin und histaminähnlichen Substanzen (sog. H-Substanzen) hervorgerufen werden. Zu den vielen Vorgängen und Stoffen, die in vivo H-Substanzen freisetzen, gehören :

1. Der Kontakt eines Antigens mit aktiv oder passiv sensibilisierten Gewebszellen,

2. ganz allgemein geschädigte Zellen, ohne daß die Histaminabgabe unbedingt mit einer Zellschädigung verbunden sein müßte,
3. "Dextran" sowie andere hochmolekulare Verbindungen und
4. proteolytische Fermente.

Die Ursache für die Freisetzung der H-Substanzen ist jedoch bis heute ungeklärt.

Wir halten es nun nach unseren Ergebnissen für möglich, daß das Lysolecithin, welches in aktivem Serum durch Antigen-Antikörper-Reaktionen und auch nach Zusatz von "Dextran" gebildet wird, nicht nur die Blutleukocyten und Tumorzellen, sondern auch Gewebszellen - insbesondere die Gefäßendothelien - schädigt. Als Folge dieser durch Lysolecithin bedingten Schädigung würden dann die Zellen zur Abgabe von H-Substanzen stimuliert.

Die experimentelle Überprüfung der hier geäußerten Hypothese überstieg den Rahmen dieser Arbeit. Ich glaube jedoch, daß diese Hypothese bei dem lückenhaften Wissen um die Einzelglieder der sicherlich sehr komplizierten Reaktionskette zwischen Antigen-Antikörper-Reaktion und der Manifestierung allergischer Organsymptome eine der Nachprüfung wert und brauchbare Arbeitshypothese darstellt.

Literaturverzeichnis

1. Robineaux, R., Lebrun, J., Ann. Inst. Pasteur
Kourillsky, R., Dlauny, A. 77, 710 (1949)
2. Loewenthal u. Jahn Z.f. Krebsforschung
138, 439 (1932)
3. Barker, S.B. u. biol.Chemistry
Summerson, J. 138, 535 (1941)
4. Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Tumoren,
Berlin 1926
5. Umbreit, W.W., Burris, H. Manometric techniques and related
u. Stauffer, J.F. methods for the study of tissue metabo-
lism, Burgess Publ. Minneapolis 1947
6. Beck, W.S., u. Valentine, J. lab.clin.med. 38 (1951)
7. Fischer, H., Fritzsche, W., Klin.Wochenschr. Jahrg. 36, Heft 3,
Schwick, G., u. Schultze, H.E. 100-107 (1958)
8. Buchner, H. München med.Wochenschr. Bd. 36,
22, 42 (1889)
9. Pfeiffer, R. Centralblatt f. Bakteriologie. Bd. 37,
131-138 (1904)
10. v. Behring, E. Ztschr. f. Hyg. Bd. 8, 412-433,
Leipzig (1890)
11. Ehrlich, P. Gesammelte Arbeiten zur Immunitäts-
forschung (1904)
12. -
14. Friedberger Z.f. Immunforsch. 4, 636 (1910)
Z.f. Immunforsch. 15, 475 (1912)
Z.f. Immunforsch. 18, 227 (1913)
15. Heidelberger, Treffers, M., Bacteriol. Rev. 3, 50-95, 1939,
Schoenheimer, R., Ratiner, zit. nach Hansen, Lb. 1, Allergie 1957
S., u. Rittenberg, D.
16. Heidelberger J. Biol. Chem. 143, 567-574 (1942)
17. Heidelberger u. Mayer, M. Advances in Enzymology 8, 71 (1948)

18. Bordet, J. L'immunité dans les maladies infectieuses, Paris 1920 (1939)
19. Fischer, H. Über die Beteiligung von Serumkomplement an immunologischen Vorgängen. Vortrag, gehalten in Leipzig, Oktober 1960
20. Fischer, H. u. Haupt, I. Über das cytolisierende Prinzip von Serum-Komplement, Naturwissenschaften, 6, S.137 (1960)
22. Friedensthal, H. Berliner klin. therap. Wschrft. 12, 342 (1904)
23. Bergenhem, B. Acta path. microbiol. scand., Suppl. 39-41 1 (1938)
24. Bergenhem B. u. Fahraeus, R. Z. f. ges. exp. Med. 97, 555 (1936)
25. Isliker, H. Schweiz. med. Wschr. 88, 127 (1958)
26. Fischer, H. Über unspezifische zelluläre und humorale Abwehrmechanismen
Arzneim. -Forsch. 10, 214-215 (1960)
27. Reißland Ztschr. f. exp. Med. 133, S. 244 (1960)
28. Schwab J. exp. Med. 91, 505 (1950)
29. Seelich u. Stockinger Naturwiss. 41, 376 (1954)
30. Dies Z. f. Immunforsch. 113, 271 (1956)
31. Hartmann, J.P. u. Hoch, W.S. Changes in Blood
Leucocytes Resulting from Antigen-Anti-body-Reaktion
Ann. J. Physiol. 183, 214 (1955)
32. Waksman, B. H. u. Gaultitz, D. Specific white cell lysis produced by combination of rabbit antiserum to purified protein. J. Immunol. 70:331 (1953)
33. Rice, C.E. Relative Effects of Various Agents on Complement and Antibody Production. J. Immunol. 73:375 (1954)

34. Favour, C. B. The role of complement in the lysis of leucocytes by Tuberculo-protein.
Exp. Biol. u. Med. 71, 592 (1949)
35. Favour, C. B., Miller, J. M., Wilson, B. A. u. A plasma factor responsible for in vitro lysis of leucocytes by Tuberculo-protein
Umbarger, M. A.
36. Pillemer, L. Natural resistance to infection
Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 233 (1956)
37. Metschnikoff, E. Arb. zool. Inst. Univ. Wien u. zool. stat. Triest
Bd. 5, H2 (1883), zit. n. Herrlinger
38. Landsteiner, K. Münch. med. Wochenschr. 51, 1185 (1904)
39. Haurowitz, F. u. Yenson J. Immunol. 47, 309 (1943)
40. Pillemer, L., Ecker, E. E. J. Immunol. 45, 51 (1952)
41. Levine, L. u. Mayer, M. J. Immunol. 73, 426, 435 (1954)
42. Levine, L., Mayer, M., J. Immunol. 73, 445 (1954)
Marucci, A. A.
- 43.
- 44.
45. zit. nach Hansen : Lb. Allergie (1957)
46. Kabat, E. A., Mayer, M. M. Experimental Immunchemistry, Illinois;
Thomas, Springfield (1948)
47. Fischer, H., Haupt, I. Z. Naturforschung 16b, 321-328 (1961)
48. Singer, K. The Lysolecithin fragility test. (Sonderdruck)
49. Jung, F. Über die Hämolyse durch Lysolecithin.
Acta biol. et med. germ. 2, 481-495 (1959)
50. Robinson, N. u. The physical properties of Lysolecithin and
Saunders, L. its sols. J. Pharm. (Lond.) 10 Part I 384-391,
Part II 755-761 (1952)

VERSUCHSPROTOKOLL

I. Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Stoffwechsel von Schweineleukocyten

a) Versuch vom 3.5.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)
Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,37	3,60
Leukocyten+AAK-Serum	0,38	3,49
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,31	2,00
Leukocyten+AAK-Serum-Extrakt	0,07	1,62

b) Versuch vom 10.5.60

Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,42	3,24
Leukocyten+AAK-Serum	0,45	2,31
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,40	2,11
Leukocyten+AAK-Serum-Extrakt	0,33	2,08

c) Versuch vom 20.9.60

Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,34	5,23
Leukocyten-AAK-Serum	0,42	5,25
Leukocyten-Aktivserum-Extrakt	0,28	3,00
Leukocyten+AAK-Serum-Extrakt	0,08	2,88

II. Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Stoffwechsel von Mäuse-Ascites-Tumorzellen

d) Versuch vom 29.4.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)
Tumorzellen+Serum (Kontrolle)	5,58	9,4
Tumorzellen+AAK-Serum	5,28	7,38
Tumorzellen+Aktivserum-Extrakt	4,43	4,14
Tumorzellen+AAK-Serum-Extrakt	1,97	2,93

e) Versuch vom 10.5.60

Tumorzellen+Serum (Kontrolle)	4,67	
Tumorzellen+AAK-Serum	3,73	
Tumorzellen+Aktivserum-Extrakt	0,22	
Tumorzellen+AAK-Serum-Extrakt	0,00	

f) Versuch vom 21.6.60

Tumorzellen+Serum (Kontrolle)	4,50	15,82
Tumorzellen+AAK-Serum	4,04	12,17
Tumorzellen+Aktivserum-Extrakt	2,70	3,82
Tumorzellen+AAK-Serum-Extrakt	0,96	1,95

III. Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf Schweineleukocyten während ihres Ablaufes im Serum

g) Versuch vom 30.11.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/3Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/3Std.)
Leukocyten+Aktivserum (Kontrolle)	0,41	1,24
Leukocyten+Serum+Antigen	0,26	0,78
Leukocyten+Serum+Antikörper	0,23	0,50
Leukocyten+AAK-Serum	0,31	0,13

h) Versuch vom 7.12.60

Leukocyten+Aktivserum (Kontrolle)	0,32	0,93
Leukocyten+Serum+Antigen	0,38	0,90
Leukocyten+Serum+Antikörper	0,35	0,83
Leukocyten+AAK-Serum	0,50	0,50

i) Versuch vom 11.1.61

Leukocyten+Aktivserum (Kontrolle)	0,48	0,33
Leukocyten+Serum+Antigen	0,47	0,20
Leukocyten+Serum+Antikörper	0,44	0,23
Leukocyten+AAK-Serum	0,62	0,15

IV. Die Wirkung von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf den Stoffwechsel von Mäuse-Ascites-Tumorzellen während ihres Ablaufes im Serum

k) Versuch vom 6.10.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mm ² /10 ¹⁰ Z/2 $\frac{3}{4}$ Std.)	Milchsäurebildung (mm ² /10 ¹⁰ Z/2 $\frac{3}{4}$ Std.)
Tumorzellen+Ringer (Kontrolle)	0,73	0,03
Tumorzellen+Serum+Antigen	0,56	0,07
Tumorzellen+Serum+Antikörper	0,56	0,30
Tumorzellen+AAK-Serum	0,52	0,23

l) Versuch vom 17.10.60

Tumorzellen+Ringer (Kontrolle)	1,01	0,02
Tumorzellen+Serum+Antigen	1,02	0,45
Tumorzellen+Serum+Antikörper	ausgef.	ausgef.
Tumorzellen+AAK-Serum	0,91	0,47

m) Versuch vom 1.11.60

Tumorzellen+Ringer (Kontrolle)	1,01	0,01
Tumorzellen+Serum+Antigen	1,28	0,30
Tumorzellen+Serum+Antikörper	1,27	0,25
Tumorzellen+AAK-Serum	1,16	0,21

n) Versuch vom 3.11.60

Tumorzellen+Aktivserum (Kontrolle)	1,80	0,45
Tumorzellen+Serum+Antigen	1,60	0,35
Tumorzellen+Serum+Antikörper	1,62	0,20
Tumorzellen+AAK-Serum	1,69	0,14
Tumorzellen+Ringer	0,90	ausgef.

V. Die Wirkung von D e x t r a n auf den Stoffwechsel von Leukocyten

o) Versuch vom 5.7.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ⁻¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ⁻¹⁰ Z/2Std.)
Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,28	3,48
Leukocyten+Dextraserum	0,20	3,11
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,33	1,10
Leukocyten+Dextraserum-Extrakt	0,40	1,12

p) Versuch vom 12.7.60

Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,21	
Leukocyten+Dextraserum	0,28	
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,33	
Leukocyten+Dextraserum-Extrakt	0,16	

q) Versuch vom 26.9.60

Leukocyten+Serum (Kontrolle)	0,31	
Leukocyten+Dextraserum	0,32	
Leukocyten+Aktivserum-Extrakt	0,40	
Leukocyten+Dextraserum-Extrakt	0,03	

VI. Die Wirkung von D e x t r a n auf den Stoffwechsel von Tumor-
zellen

r) Versuch vom 21.6.60

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäurebildung (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)
Tumorzellen+Serum (Kontrolle)	4,50	15,82
Tumorzellen+Dextran-serum	4,30	15,48
Tumorzellen+Aktivserum-Extrakt	2,71	3,82
Tumorzellen+Dextran-serum-Extrakt	1,05	3,43

s) Versuch vom 29.6.60

Tumorzellen+Serum (Kontrolle)	6,24	9,40
Tumorzellen+Dextran-serum	5,46	6,86
Tumorzellen+Aktivserum-Extrakt	4,51	7,38
Tumorzellen+Dextran-serum-Extrakt	2,81	3,61

VII. Die Wirkung von Lysolecithin auf den Stoffwechsel von Schweineleukocyten und Mäuse-Ascitestumorzellen

t) Versuch vom 9.2.61

Versuchsansatz	O ₂ -Verbrauch (mM/10 ¹⁰ Z/2Std.)	Milchsäure- bildung ₁₀ (mM/10 ¹⁰ Z/ 2 Std.)
Tumorzellen+Ringer (Kontrolle)	0,50	
Tumorzellen+ 10 γ Lysolecithin/ml	0,50	
Tumorzellen+ 45 γ " "	0,49	
Tumorzellen+ 85 γ " "	0,46	
Tumorzellen+ 165 γ " "	0,24	
Tumorzellen+ 600 γ " "	0,20	
Tumorzellen+ 1000 γ " "	0,05	

u) Versuch vom 16.2.61

Tumorzellen+Ringer (Kontrolle)	2,80	
Tumorzellen + 15 γ Lysolecithin/ml	2,79	
Tumorzellen + 65 γ " "	2,00	
Tumorzellen + 165 γ " "	1,99	
Tumorzellen + 250 γ " "	1,88	
Tumorzellen + 500 γ " "	1,64	
Tumorzellen + 1000 γ " "	1,45	

v) Versuch vom 19.7.60

Leukocyten+Ringer (Kontrolle)	0,18	
Leukocyten+ 12 γ Lysolecithin/ml	0,17	
Leukocyten+ 40 γ " "	0,17	
Leukocyten+ 80 γ " "	0,20	
Leukocyten+ 165 γ " "	0,14	

w) Versuch vom 4.10.60

Leukocyten+Ringer (Kontrolle)	0,58	
Leukocyten+ 25 γ Lysolecithin/ml	0,56	
Leukocyten+ 41 γ " "	0,58	
Leukocyten+ 82 γ " "	0,73	
Leukocyten+ 165 γ " "	0,57	
Leukocyten+ 330 γ " "	0,53	

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Über die Veränderungen des Stoffwechsels von Leukocyten und Tumorzellen durch Antigen-Antikörper-Reaktionen"

in der I. Medizinischen Klinik zu Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr.med.H.Fischer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan "Klin. Wochenschrift, 41. Jahrgang, 1. Heft, 1. Jan. 63, S. 10-14" zum Teil veröffentlicht.

Frankfurt/Main, den 22. Febr. 1963

Horst Herrschaft

Lebenslauf

Am 19. März 1937 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Friedrich Herrschaft und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Urmann, in Gelsenkirchen geboren.

Nach mehrmaligem Schulwechsel, bedingt durch Evakuierung in den letzten Kriegsjahren, trat ich 1948 in die Realschule in Minden (Westfalen) ein. Wegen erneutem, zweimaligem Wohnungswechsel besuchte ich dann anschließend das humanistische Gymnasium in Heinsberg (Rhld.) und das math. -naturwissenschaftliche und neusprachliche Grillo-Gymnasium in Gelsenkirchen, an dem ich im März 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1957 begann ich an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main das Medizinstudium und bestand dort im Oktober 1959 die ärztliche Vorprüfung.

Den klinischen Teil des Studiums absolvierte ich in Zürich/Schweiz und in Frankfurt am Main.

In Frankfurt am Main legte ich im Februar 1963 die ärztliche Prüfung ab.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Universität Frankfurt/M.:

Anatomie :	Prof. Starck Prof. Ortmann
Physiologie, Physiologische Chemie :	Prof. Felix Prof. Róka Prof. Wezler
Innere Medizin:	Prof. Hoff Prof. Fischer Prof. Hildebrandt Prof. Gebauer Prof. Schrade Prof. Martin Prof. Radenbach Prof. Jürgens Prof. Altmann
Chirurgie:	Prof. Geißendörfer Prof. Ungeheuer Priv. Doz. Weber Prof. Westermann
Pädiatrie:	Prof. de Rudder Frau Prof. K. Weisse
Dermatologie:	Prof. Herrmann Prof. Leonhardi
Psychiatrie, Neurologie :	Prof. Krücke Prof. Zutt Prof. Frowein Prof. Schwab
Pathologie:	Prof. Rotter Prof. Kahlau Prof. Sandritter
Augenheilkunde:	Prof. Thiel Priv. Doz. Otto
Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde :	Prof. Mittermaier
Hygiene :	Prof. Herzberg
Pharmakologie :	Prof. Holtz
Orthopädie :	Prof. Güntz Priv. Doz. Schoberth
Frauenheilkunde:	Prof. Schwenzer Prof. Heller
Strahlenkunde :	Prof. Strnad

Universität Zürich :

Prof. Leuthardt
Prof. Hegglin Prof. Koller
Prof. Brunner Prof. Buff Prof. Senning
Prof. Fanconi Prof. Grob Priv. Doz. Willi Prof. Burckhardt Prof. Storck
Prof. M. Bleuler Priv. Doz. Stoll Prof. Krayenbühl

